Journal of Iranian Plant Protection Research

https://jpp.um.ac.ir

Research Article
Vol. 37, No. 4, 2024, p. 381-398

Evaluation The Sub-Inhibitory Concentrations of Some Plant Essential Oils on Investigating Factors of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

S. Ghorbanpour-Yadaki1[1], S. Baghaee-Ravari[2*], M. Moghaddam[3], P. Khodaygan[4]

1 and 2- MS.C. Graduated and Associate Professor in Plant Pathology, Department of Plant Protection, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: s.baghaee@um.ac.ir)
3- Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
4- Associate Professor, Department of Crop Protection, Faculty of Agriculture, Vali-Asr University, Rafsanjan, Iran

Received: 04-04-2023 Revised: 26-09-2023 Accepted: 30-09-2023 Available Online: 30-09-2023	**How to cite this article:** Ghorbanpour-Yadaki, S., Baghaee-Ravari, S., Moghaddam, M. & Khodaygan, P. (2024). Evaluation the sub-inhibitory concentrations of some plant essential oils on virulence factors of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Journal of Iranian Plant Protection Research*, *37*(4), 381-398. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jpp.2023.81813.1141

Introduction

One of the important bacterial diseases of stone-fruit trees is canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss). This pathogen employs a vast range of pathogenic and virulence factors during its interaction with its host in order to induce disease symptoms. To control the bacterial canker disease, various methods such as sanitary measures, selection of resistant cultivars and certified seedlings and chemical component based on copper are used. Application pf plant derivatives such as essential oils and extracts, is one of the compatible management methods in line with environmental goals. Essential oils include a wide range of antimicrobial components and have high efficacy, multiple mechanisms of action, and low toxicity on non-target organisms. The current study aimed to assess the inhibitory and sub-inhibitory effects of six indigenous medicinal essential oils against the causative agent of canker disease in stone fruits. The research evaluated the efficacy of these essential oils in reducing the virulence factors of the disease while identifying the active compounds within the oils.

Material and Methods

The antimicrobial properties of six native plant EOs, namely *Thymus transcaspicus*, *Satureja khuzistanica*, *Mentha longifolia*, *Ziziphora clinopodioides*, *Perorkia abrotanoides*, and *Artemisia persica* were evaluated against Pss bacteria based on disc diffusion assay test and measurement of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Moreover, the effect of essential oils on some virulence factors of pathogen including motility, biofilm, and syringomycine production was investigated in sub-inhibitory concentrations. The effect of selected EOs on the reduction of bacterial pathogenicity on immature cherry fruitlets was also investigated. Finally, the chemical composition of EOs was determined using gas chromatography–mass spectrometry (GC-Ms).

Results and Discussion

https://doi.org/10.22067/jpp.2023.81813.1141

All studied essential oils have different antibacterial effects in interaction with Pss bacteria. EOs of *T. transcaspicus* and *S. khuzistanica* showed a significant inhibitory effect with minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) value of 1.16 and 2.32 g L^{-1}, respectively against Pss compared with other essential oils and streptomycin antibiotic. Sub-inhibitory concentrations test of EOs showed no significant effect on the growth pathogen. The swarming motility of bacterial cells treated with essential oil decreased by 25-55% and the swimming motility decreased by 18.42 to 35.71% compared with the control. *T. transcaspicus* and *S. khuzistanica* within the range of 70-75% showed the strongest inhibitory effect on biofilm formation. Also, in the toxin production test, *T. transcaspicus* and *S.khuzistanica* EOs are effective in reducing syringomycin production and increasing the growth of *Geotrichum candidum* by 1.5 to 1.76 times compared with control (not treatment with EOs). The EOs treatment at MICs reduced the symptoms of the disease. In immature cherries inoculated with Pss bacterium and treated with EO of *T. transcaspicus* was not observed necrosis symptom. The four selected essential oils tested all had a role in reducing the virulence factors in Pss, and the degree of effectiveness is different depending on the components of the essential oil. The higher the phenolic content in the essential oil, the greater its antimicrobial properties against plant pathogenic bacteria. According to the EOs analysis, thymol in *T. transcaspicus*, carvacrol in *S. khuzistanica*, piperitone in *M. longifolia*, and pulegone in *Ziziphora clinopodioides* were the major constituent compound. It seems that the highest amounts of compounds in essential oils have a higher antibacterial power. The EOs of *T. transcaspicus* and *S. khuzistanica* effectively reduce the pathogenic activity of bacterial cankers agent in stone fruits.

Conclusion

The studied plant compounds in sub-inhibition concentration showed acceptable potential in inhibiting pathogenic agents in *in vitro* tests. Taking into account the growing trend of the general acceptance of natural control compounds in the field of plant diseases, it seems that planning in line with how to use plant products to reduce the consumption of pesticides can be investigated and needs complementary experiments. In order to reduce the spread of bacterial canker symptoms and increase the life span of the tree, the main effective substances (oxygenated monoterpenes) of the essential oils of *T. transcaspicus* and *S. khuzistanica* can be used as a model chemical structure for the synthesis of antimicrobial substances using the experts in the field of chemistry and pharmaceuticals. It is suggested to investigate the stability and preservation of antimicrobial properties in laboratory and field conditions.

Keywords: Canker of stone fruits, Control, Pathogenicity reduction, Plant volatiles, Sub-inhibitory concentration

نشریه پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۳۷ شماره ٤، زمستان ١٤٠٢، ص. ۳۹۸-۳۸۱

بررسی غلظت‌های زیر بازدارندگی برخی اسانس‌های گیاهی بر فاکتورهای پرآزاری بیمارگر *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

سحر قربانپور یدکی[۱]- ساره بقائی راوری[۲]- محمد مقدم[۳]- پژمان خدایگان [٤]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۰۸

چکیده

از بیماری‌های مهم باکتریایی درختان میوه، شانکر باکتریایی درختـان هسـته‌دار بـا عامـل *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) می‌باشد. در این پژوهش، خصوصیات ضدباکتریایی شش اسانس گیاهی علیه باکتری Pss براساس آزمون نشت در دیسک، تعیین حداقل غلظت بازدارنده و حداقل غلظت کشنده ارزیابی و گروه‌بندی شد. تأثیر غلظت زیربازدارندگی اسانس‌های منتخب بـر برخـی عوامـل پـر آزاری بیمـارگر و نیـز اثرگـذاری اسانس‌های منتخب بر کاهش بیماری‌زایی باکتری روی میوه نارس گیلاس بررسی و ترکیبات اسانس‌ها مشخص گردید. براساس نتـایج، اسـانس مـرزه خوزستانی و آویشن خراسانی اثر بازدارندگی قابل‌توجهی با حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی ۱/۱۶ و ۲/۳۲ گرم بر لیتر بر باکتری Pss، در مقایسه با سایر اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین نشان دادند. اسانس‌های منتخب در غلظت زیر بازدارندگی از رشد بیمارگر جلوگیری نکردند. قابلیت تحـرک توده‌ای سلول‌های تحت تیمار اسانس‌ها نسبت به شاهد ۲۵ تا ۵۵ درصد و قابلیت تحـرک شـناوری ۱۸/۴۲ تـا ۷۱/ ۳۵ درصـد کـاهش یافـت. آویشـن خراسانی و مرزه خوزستانی با درصد بازدارندگی به‌ترتیب ۷۵ و ۷۰ درصد قوی‌ترین اثر مهارکنندگی را بر میزان تشکیل بیوفیلم نشان دادند. همچنین، در آزمون تولید توکسین، دو اسانس آویشن خراسانی و مرزه خوزستانی درکاهش تولید سیرینگومایسین و افزایش رشد قـارچ *Geotrichum candidum* به‌ترتیب به میزان ۱/۷۶ و ۱/۵ برابر در مقایسه با شاهد (عدم تیمار با اسانس) مؤثر بودند. تیمار اسانس‌ها در مقادیر حداقل غلظت بازدارنده سبب کاهش علائم بیماری شد. بر اساس آنالیز اسانس‌ها به‌ترتیب تیمول در اسانس آویشن خراسانی، کارواکرول در اسانس مرزه خوزستانی، پیپریتون در اسانس پونـه کوهی و پولگون در اسانس کاکوتی به‌عنوان ترکیبات عمده تعیین شد. به‌طور کلی، نتایج این تحقیق نشان داد مـواد مـؤثره اصـلی دو اسـانس آویشـن خراسانی و مرزه خوزستانی در کاهش فعالیت بیمارگر شانکر باکتریایی هسته‌داران مؤثر هستند که می‌توانند به‌عنوان ساختار شیمیایی الگو در جهت سنتز مواد ضدمیکروبی مد نظر قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: شانکر هسته‌داران، غلظت زیر-بازدارندگی، کاهش بیماری‌زایی، کنترل، مواد فرار گیاهی

مقدمه

درختان میوه هسـته‌دار جـزء خـانواده گلسـرخیان و زیـر خـانواده آلوسانان و جنس آلو هستند که بـه‌صـورت درخـت یـا درختچـه‌هـای خزان‌دار یا همیشـه‌سـبز هسـتند (Rasoolzadegan, 1997). شـانکر باکتریایی با عامل *Psedomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) یکی از بیماری‌های مهم خسارت‌زای هسته‌داران است کـه بـه‌عنـوان یک تهدید بالقوه برای تولید، کشت و پرورش درختان میـوه هسـته‌دار محسوب می‌شود (Farhadfar *et al.*, 2016).

این بیمارگر دامنه‌ی میزبانی وسیعی دارد و جدایه‌های آن از نظـر خصوصیات بیوشیمیایی، بیماری‌زایی و ژنتیکی تفاوت‌های زیادی دارد (Gasic *et al.*, 2012). در ایران این بیماری اولین بـار روی درختـان

۱ و ۲- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی و دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد ، ایران
(*- نویسنده مسئول: (Email: s.baghaee@um.ac.ir
۳- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشـهد، ایران
۴- دانشیار گروه گیـاه‌پزشـکی، دانشـکده کشـاورزی، دانشـگاه ولیعصـر رفسـنجان، رفسنجان، ایران

https://doi.org/10.22067/jpp.2023.81813.1141

زردآلو در اصفهان مشاهده و میزان خسارت آن ۵۰-۲۲ درصد ذکر شد (Bahar *et al.*, 1985). نشانه‌های بیماری بستگی به رقم و سن درخت، بافت مورد حمله میزبان، نژاد بیمارگر و شرایط محیطی دارد. بارزترین علائم بیماری در طی فصل رشد در درختان میوه، به‌صورت تشکیل شانکر همراه با تراوش صمغ روی شاخه و تنه درختان و در برگ‌ها به شکل لکه‌های آبسوخته است که در نهایت قهوه‌ای و خشک‌شده و حالت غربالی را در برگ‌ها ایجاد می‌کند (Agrios, 2005). بیماری به شکوفه‌ها و شاخه‌های گل‌دهنده سرایت کرده و موجب مرگ سریع شاخه‌ها نیز می‌شود (Spotts *et al.*, 2010). جمعیت این باکتری در طی فصل رشد درختان در حال تغییر و نوسان است. از عوامل اصلی افزایش یا کاهش جمعیت، دمای محیط و میزان بارندگی است (Agrios, 2005).

این بیمارگر در تعامل با میزبان از طیف وسیعی از عوامل بیماری زایی و پرآزاری استفاده می‌کند تا بتواند علائم بیماری را در میزبان-های خود القاء کند (Ichinose *et al.*, 2013). برای کنترل بیماری شانکر باکتریایی از شیوه‌های مختلفی، مانند اقدامات بهداشتی، انتخاب ارقام مقاوم و نهال‌های گواهی‌شده (Bultreys & Kaluzna, 2010) و سموم شیمیایی بر پایه مس استفاده می‌شود (Kennelly *et al.*, 2007). به‌کارگیری فرآورده‌های مشتق‌شده از گیاهان مانند اسانس‌ها و عصاره‌ها، نیز یکی از روش‌های مدیریتی سازگار در راستای اهداف زیست‌محیطی است (López Belchí *et al.*, 2021). اسانس‌ها طیف گسترده‌ای از اجزاء ضدمیکروبی را در برمی‌گیرند و دارای اثربخشی بالا، عملکرد چندگانه و سمیت کم روی موجودات غیرهدف هستند (Pavela & Benelli, 2016).

در برهمکنش بین میزبان و باکتری بیمارگر، بسیاری از تمهیدات و تولیدات باکتری برای بیماری‌زایی و پرآزاری تحت کنترل سیستم حد نصاب احساس (Quorum sensing) است. این مکانیسم در تنظیم پدیده‌های مختلفی مانند تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی، تشکیل و بقای بیوفیلم، تولید متابولیت‌های ثانویه، بیماری‌زایی و پرآزاری در باکتری‌های بیمارگر نقش کلیدی دارد (Matas *et al.*, 2012).

اسانس آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) و مرزنجوش (*Oreganum vulgare*) حاوی کارواکرول بالا (به‌ترتیب ۲۹/۵ و ۱۹/۷ درصد) و تیمول کم (۱/۵ درصد) بوده و سبب مهار رشد بهتر جدایه‌های *P. syringae* نسبت به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین شده اند (Oliva *et al.*, 2015)، همچنین در مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی بیشترین اثرگذاری را روی فاکتورهای بیماری زایی جدایه‌ی Pss دارند (Carezzano *et al.*, 2017). شبانی و همکاران (Shabani *et al.*, 2019) نشان دادند که از بین شش اسانس گیاهی علیه باکتری Pss، اسانس آویشن دنایی (*Thymus daenensis*) دارای تیمول به میزان ۷۰/۳۲ درصد، بالاترین قطر هاله بازدارندگی (۲۰ میلی‌متر) و بیشترین اثر را در برابر بیمارگر دارد.

اثر بازدارندگی ۱۳ اسانس گیاهی روی جدایه Pss به‌دست‌آمده از هسته‌داران استان کرمان بررسی و نتایج آن را با اثر ۱۳ آنتی‌بیوتیک مورد مقایسه قرار دادند. نتایج حاکی از آن است که بیشترین اثر بازدارندگی روی Pss، مربوط به آنغوزه و رزماری، اثر متوسط بازدارندگی مربوط به اسانس‌های نعناع، زوفا (*Hyssopus officinalis*)، اسطوخودوس (*Lavandula stoechas*) و آلاله (*Ranunculus sceleratus*) است و کمترین اثر بازدارندگی را گیاهان بومادران (*Achillea millefolium*)، کلپوره (*Teucrium chamaedrys*) و رازیانه (*Foeniculum vulgaris*) دارند و جدایه‌ها نسبت به استرپتومایسین و اریترومایسین نیز حساس بودند (Khodaygan *et al.*, 2012).

ازآن‌جاکه خسارت بیماری شانکر باکتریایی در درختان میوه هسته‌دار، کاهش کمیت و کیفیت محصولات را به دنبال دارد، به منظورکاهش گسترش علایم بیماری، افزایش طول عمر درخت و داشتن عملکرد نسبی برای باغدار می‌توان از مواد مؤثره اصلی اسانس‌های گیاهی به‌عنوان ساختار شیمیایی الگو، در جهت سنتز مواد ضدمیکروبی و یا تغییرات در گروه‌های عاملی مواد ضدمیکروبی حاضر در جهت بهبود کارکرد، ایده گرفت. پژوهش حاضر، باهدف ارزیابی اثر بازدارندگی و زیربازدارندگی شش اسانس دارویی بومی علیه عامل بیماری شانکر باکتریایی هسته‌داران انجام شده است. اثر اسانس‌های منتخب در کاهش فاکتورهای پرآزاری بیمارگر ارزیابی و ترکیبات مؤثره اسانس‌ها نیز مشخص شده است.

مواد و روش‌ها

جدایه‌ی باکتریایی مورد استفاده

باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* از کلکسیون گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی شیراز (جدا شده از درختان میوه هسته‌دار) برای انجام آزمایشات تهیه گردید.

تهیه و استخراج اسانس از نمونه‌های گیاهی

نمونه‌های گیاهی کاکوتی، آویشن خراسانی، برازمبل، پونه کوهی، درمنه از مناطق مختلف استان خراسان رضوی جمع‌آوری و مرزه خوزستانی از شرکت خُرّمان (خرم‌آباد، ایران) تهیه شد (جدول ۱). بعد از شناسایی گونه‌های ذکر شده، مراحل بعدی شامل خشک‌کردن و آماده کردن نمونه‌ها جهت اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب و به‌وسیله دستگاه کلونجر انجام شد (Jaymand & Rezaee, 2007). استخراج اسانس برای هر نمونه گیاهی در چهار تکرار و برای هر تکرار ۱۰۰ گرم از نمونه گیاهی خرد شده استفاده شد. پس از استخراج، برای انجام عمل آب‌گیری اسانس‌ها از سولفات سدیم

خشک استفاده شد. اسانس‌ها در ظروف شیشه‌ای تیره در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Ramezaniam *et al.*, 2016). به‌منظور بهبود توزیع اسانس در محیط کشت، محلول امولیسیفایر (اتانول ۲۰ درصد و توئین ۲۰) را به نسبت ۱ به ۱ با اسانس به‌صورت یکنواخت مخلوط و در انجام آزمایشات از آن استفاده شد.

جدول ۱- اسانس‌های گیاهی مورد استفاده در آزمایش‌ها

Table 1- List of used plant essential oils and related distilled organ

نام علمی Scientific Name	خانواده گیاهی Plant Family	نام فارسی Persian Name	اندام تقطیرشده Distilled Organ
Thymus transcaspicus	Lamiaceae	آویشن خراسانی	برگ (leaf)
Satureja khuzistanica	Lamiaceae	مرزه خوزستانی	برگ(leaf)
Ziziphora clinopodioides	Lamiaceae	کاکوتی	برگ(leaf)
Mentha longifolia	Lamiaceae	پونه کوهی	برگ(leaf)
Perorkia abrotanoides	Lamiaceae	برازمبل	برگ(leaf)
Artemisia persica	Asteraceae	درمنه	برگ(leaf)

بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس با روش نشت درمحیط کشت

ارزیابی اثر ضدباکتریایی اسانس‌های مورد آزمون از روش نشت در دیسک طبق اصول CLSI (CLSI, 2018) انجام گرفت. مقدار ۱۰۰میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت $CFU.ml^{-1}$ ۱۰^۸×۱ روی پتری‌های حاوی نوترینت آگار منتقل و به‌وسیله سوآپ سترون در سه جهت مختلف کشت شد. دیسک‌های به قطر شش میلی‌متری روی محیط قرار گرفته و به آن‌ها ۲۰ میکرولیتر (۱۸/۵میلی‌گرم) اسانس اضافه شد. تشتک‌های پتری به‌مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس اثر اسانس بر رشد باکتری با اندازه‌گیری هاله بازدارنده مورد بررسی قرار گرفت. از دیسک‌های آغشته به توئین ۲۰ و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (۱۸/۵ میلی‌گرم) به‌ترتیب، به‌عنوان شاهد منفی و مثبت استفاده گردید. آزمون برای هر تیمار با چهار تکرار انجام گرفت.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)[1] و حداقل غلظت کشندگی (MBC)[2]

برای تعیین باکتری‌ایستایی و باکتری‌کشی اسانس‌های گیاهی و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (به‌عنوان معیار) از روش میکرودیلوشن در محیط مایع[3] استفاده شد. برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس از سری رقت از هر اسانس از غلظت ۱۸/۵ تا ۱/۸۵ میلی‌گرم در حجم ۲۰۰ میکرولیتر به روش رقیق‌سازی متوالی در محیط نوترینت براث (NB) با چهار تکرار در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای تهیه و سپس چاهک‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. حداقل غلظت مهارکنندگی که حاوی کمترین غلظت اسانس بود و در آن باکتری رشد قابل‌رؤیتی نداشت، به‌عنوان MIC انتخاب گردید. در مرحله بعد برای تخمین حداقل غلظت کشندگی، مقدار ۱۰ میکرولیتر از محتویات چاهک‌های بدون رشد که در آن‌ها کدورت قابل‌مشاهده‌ای ایجاد نشده بود، روی محیط کشت نوترینت آگار کشت شد. بعد از مدت‌زمان انکوباسیون، کمترین غلظتی از اسانس که باکتری رشدی روی محیط جامد نداشت، به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد. از چاهک حاوی محیط کشت و فاقد باکتری برای کنترل منفی و از چاهک حاوی باکتری و محیط کشت برای کنترل مثبت استفاده شد (Hajian-Maleki *et al.*, 2019).

همچنین در این آزمایش، غلظت زیر بازدارندگی (Sub-MICs)[4] اسانس که تأثیر باکتری‌کشی یا باکتری ایستایی قابل‌مشاهده‌ای روی سلول‌های باکتری نداشتند با تعیین OD در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه الیزا ریدر (AWARNESS Tech. Inc. USA Stat Fax 2100) تعیین گردید. اثر غلظت زیربازدارندگی بر فاکتورهای پرآزاری جدایه بیمارگر مورد مطالعه، ارزیابی شد.

بررسی اثر اسانس بر رشد باکتری

به‌منظور بررسی عدم تأثیرگذاری مقادیر زیر بازدارندگی اسانس‌های گیاهی مورداستفاده در آزمون و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین روی رشد سلول‌های باکتری، سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط نوترینت براث به غلظت $CFU\ ml^{-1}$ ۱۰^۸×۱ در پلیت ۹۶ خانه تهیه و مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک پلیت افزوده شد.

1- Minimum Inhibitory Concentration
2-Minimum Bactericidal Concentration
3- Broth microdilution

4- Sub-Minimum Inhibitory Concentration

سپس پلیت کشت آماده شده درون شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. تغییرات رشد باکتری در بازه‌های چهارساعته به‌وسیله دستگاه الیزاریدر در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند. این آزمایش در دو نوبت مستقل با ۴ تکرار انجام گرفت.

بررسی اثر اسانس بر تشکیل بیوفیلم باکتری

برای اندازه‌گیری میزان بیوفیلم، غلظت‌های انتخاب شده اسانس های گیاهی و استرپتومایسین در چاهک‌های پلیت با حجم ۲۰۰ میکرولیتر آماده و سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به هر چاهک افزوده و پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به صورت ساکن به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. پس از این مدت زمان، محتویات پلیت را خالی و چاهک‌ها را با آب مقطر سترون شست‌وشو داده و در دمای اتاق به حالت برعکس قرارداده تا خشک شوند و به هر چاهک ۲۰۰میکرولیتر محلول کریستال ویوله ۰/۱ درصد جهت رنگ‌آمیزی در چاهک‌ها افزوده شد. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، شستشو با آب مقطر سترون انجام گرفت. در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد جهت حل کردن رنگ متصل به چاهک‌ها اضافه و بعد از ۱۰ دقیقه میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر اندازه‌گیری شد (Santos *et al.*, 2020).

بررسی اثر اسانس بر تحرک باکتری

برای بررسی میزان حرکت شناوری[1] و توده‌ای[2] در بیمارگر، سوسپانسیونی از کشت تازه باکتری در محیط نوترینت براث به غلظت 1×10^{8} $CFUml^{-1}$ تهیه و تحت تیمار غلظت‌های زیر بازدارندگی اسانس‌های گیاهی و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین قرار گرفت. دو میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تحت تیمار اسانس به‌صورت نقطه ای در مرکز تشتک پتری حاوی لوریا برتانی براث و ۰/۳ درصد آگار برای حرکت شناوری و ۸ گرم بر لیتر نوترینت براث، ۰/۵ درصد آگار و ۵ گرم بر لیتر گلوکز برای حرکت توده‌ای مایه‌زنی و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند (O'May & Tufenkji, 2011). از سوسپانسیون باکتری که تحت تیمار اسانس قرار نگرفت به‌عنوان شاهد مثبت آزمون استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت میزان تحرک باکتری اندازه‌گیری شد. آزمون در سه تکرار انجام گرفت.

بررسی اثر اسانس بر تولید سیرینگومایسین

بررسی میزان تولید سیرینگومایسین در جدایه Pss در شرایط حضور و عدم حضور اسانس با استفاده از جدایه قارچ *G. candidum* (تهیه‌شده از آزمایشگاه میکروبیولوژی گروه صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد) انجام شد. جدایه باکتری تحت تیمار غلظت زیر بازدارندگی اسانس‌ها روی محیط کشت PDA به صورت خطی در یک سمت تشتک پتری کشت داده و به مدت پنج روز در دمای ۲۸-۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. بعد از این مدت زمان تشتک پتری‌ها تحت بخار کلروفرم به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و در آخر دیسکی از پرگنه قارچ در قسمت مرکزی تشتک پتری قرار داده شد. میزان رشد قارچ براساس میزان سیرینگومایسین تولیدی توسط باکتری تحت تیمار اسانس‌ها، بعد از ۲۴ ساعت اندازه‌گیری شد (Hwang *et al.*, 2005). از سوسپانسیون باکتری که تحت تیمار اسانس‌های گیاهی قرار نگرفته بود به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

بررسی اثر اسانس بر بیماری‌زایی جدایه Pss روی میوه های گیلاس

برای ارزیابی بیماری‌زایی جدایه باکتری Pss، از میوه‌های نارس گیلاس استفاده شد. ابتدا میوه‌ها به مدت سه دقیقه درون اتانول ۵۰ درصد قرار گرفتند و سپس سه مرتبه با آب مقطر سترون شست‌وشو داده شدند. از سوسپانسیون کشت ۲۴ ساعته باکتری (OD_{600}=0.5) که تحت تیمار مقادیر حداقل غلظت بازدارنده اسانس‌های گیاهی قرار گرفته، مقدار ۲۰ میکرولیتر داخل بافت گوشتی میوه تزریق شد. پس از مایه‌زنی، میوه‌ها روی کاغذهای صافی سترون مرطوب درون پتری قرار داده شد و به مدت چهار روز در دمای ۲۴ درجه سلسیوس و رطوبت ۹۰ درصد درون ژرميناتور نگهداری و سپس علائم بر اساس میزان آب‌سوختگی و مرگ بافت مورد ارزیابی قرار گرفت. از آب مقطر سترون به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد.

شناسایی توسط کروماتوگراف گازی همراه با طیف‌سنج جرمی (GC- MS)

آنالیز ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس‌های آزمایشی منتخب به‌وسیله دستگاه گاز کروماتوگراف همراه با طیف‌سنج جرمی شرکت تکنولوژی آژلینت (Thermo Quest 2000, Lancashire, UK) انجام شد. که مجهز به ستون کروماتوگرافی HP-5ms به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت روکش فیلم ۰/۲۵ میکرومتر که به یک دستگاه سنجش جرمی چهارگانه متصل است و به یک رایانه مجهز به کتابخانه Wiley 7n.l مجهز بوده است. برنامه دمایی ۲۵۰ تا ۵۰ درجه سلسیوس با افزایش تدریجی ۳ درجه سلسیوس در هر دقیقه و نهایتا ۱۰ دقیقه در ۲۵۰ درجه سلسیوس تنظیم شد. دمای اتاقک تزریق ۲۸۰ درجه سلسیوس بود و از گاز حامل هلیوم با نرخ جریان ۰/۰۶ لیتر بر ساعت استفاده شد. سپس شناسایی هر جزء با مقایسه طیف جرمی و RI با نمونه‌های معتبر و

1- Swimming
2- Swarming

اجزای شناسایی‌شده در منابع (ازجمله Adams *et al.*, 2007) تکمیل شد. کمی‌سازی درصد نسبی هر جزء با توجه به سطح زیر پیک آن‌ها بدون در نظر گرفتن فاکتور کالیبراسیون انجام گرفت.

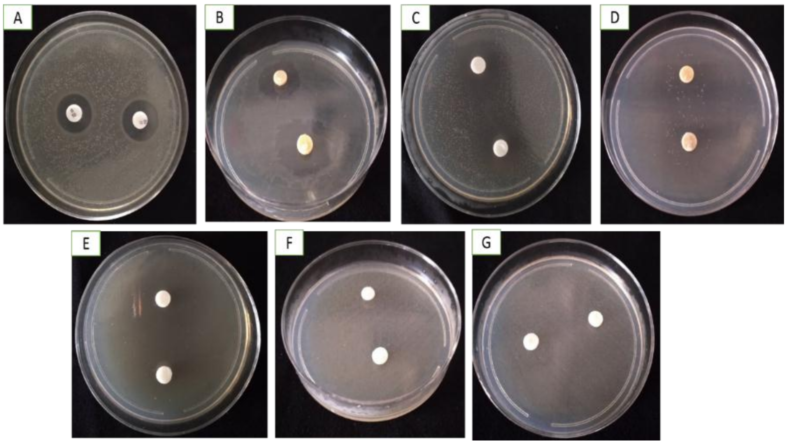
تجزیه‌وتحلیل آماری

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها و نتایج آزمون‌های زیستی با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Version 22) براساس آزمون آنالیز واریانس ارزیابی و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی دار ۵ درصد تجزیه‌وتحلیل شدند.

نتایج و بحث

بررسی میزان بازدارندگی از رشد باکتری توسط اسانس های گیاهی

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که همه اسانس های مورد مطالعه در تعامل با باکتری *Pss* اثرات ضد باکتریایی متفاوتی دارند. با توجه به شکل ۱، بیش‌ترین میزان بازدارندگی از رشد باکتری در سنجش دیسک، توسط اسانس آویشن خراسانی و مرزه خوزستانی با قطر هاله بازدارنده ۲۲ و ۲۰ میلی‌متر و بعد از آن مربوط به اسانس پونه و کاکوتی، با قطر هاله بازدارندگی به‌ترتیب ۱۳ و ۹ میلی‌متر می باشد. کمترین میزان بازدارندگی توسط اسانس برازمبل و درمنه به‌ترتیب ۷ و ۴ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. در شاهد مثبت (دیسک استاندارد استرپتومایسین) قطر هاله بازدارنده، ۱۵ میلی‌متر می‌باشد. با توجه به اثرات ضدباکتریایی مشاهده‌شده، از بین اسانس های گیاهی، اسانس آویشن خراسانی، مرزه خوزستانی، پونه و کاکوتی برای انجام آزمایشات بعدی و مقایسه با آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین انتخاب شدند.



شکل ۱- قطر هاله بازدارندگی باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* پس از قرار گیری در معرض اسانس‌های گیاهی و استرپتومایسین. A: آنتی بیوتیک B: اسانس آویشن خراسانی C: اسانس مرزه خوزستانی D: اسانس پونه E: اسانس کاکوتی F: اسانس برازمبل و G: اسانس درمنه

Figure 1- The diameter of bacterial inhibition zone of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* after being exposed to plant essential oils and streptomycin. A: antibiotic; B: *Thymus transcaspicus* oil; C: *Satureja khuzistanica;*D: *Mentha longifolia;* E: *Ziziphora clinopodioides*; F:; *Perorkia abrotanoides;* G: *Artemisia persica*

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC)

نتایج به‌دست‌آمده از آزمون حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس علیه باکتری بیمارگر نشان می‌دهد که همه اسانس‌های انتخابی روی رشد باکتری اثر بازدارنده داشته و نتایج آزمون نشت در دیسک را تأیید می‌کنند. با توجه به جدول ۲، اسانس های مرزه خوزستانی و آویشن خراسانی بیش‌ترین اثر بازدارندگی با حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی به‌ترتیب ۱/۱۶ و ۲/۳۲ گرم بر لیتر را دارند و در مرتبه بعد بیشترین تأثیر مربوط به اسانس پونه کوهی با حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی به‌ترتیب به میزان ۲/۳۲ و ۴/۶۵ گرم بر لیتر است. کمترین تأثیر نیز مربوط به اسانس کاکوتی با حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی ۴/۶۵ و ۹/۳ گرم بر لیتر می‌باشد. استرپتومایسین به‌عنوان آنتی‌بیوتیک مرجع نیز، با حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی ۲/۴۲ و ۴/۸۱ گرم بر لیتر سبب مهار رشد باکتری *Pss* شده است.

جدول ۲- نتایج آزمون نشت در دیسک و قطر هاله بازدارنده پس ازتیمار با اسانس و استرپتومایسین (۱۸/۵ میلی‌گرم بر دیسک) و سنجش مقادیر MIC، MBC و sub-MIC برحسب گرم بر لیتر روی جدایه باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* هسته‌داران

Table 2-The results of the disc diffusion test and the diameter of the inhibitory halo after treatment with essential oil and streptomycin (18.5 mg/disc) and the measurement of MIC, MBC and sub-MIC values in grams per liter on *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* of stone fruits

اسانس Essential oil	قطر هاله بازدارنده(mm) Diameter of inhibitory halo	حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)	حداقل غلظت کشندگی (MBC)	حداقل غلظت زیر بازدارندگی (Sub-MIC)
آویشن خراسانی (*Thymus transcaspicus*)	22± 0.32 a	1.16± 1.5 c	2.32± 2.3 c	0.58± 1.5 c
مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica*)	20± 0.87 a	1.16± 1.5 c	2.32± 2.3 c	0.58± 1.5 c
پونه (*Mentha longifolia*)	13± 0.93 b	2.32± 0.75 b	4.65± 2 b	1.16± 0.75 b
کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides*)	9± 0.69 c	4.65± 2 a	9.3± 0.86 a	2.32± 1.25 a
استرپتومایسین (Streptomycin)	15± 0.12 b	2.42± 2.25 b	4.81± 1.7 b	1.21± 0.68 b

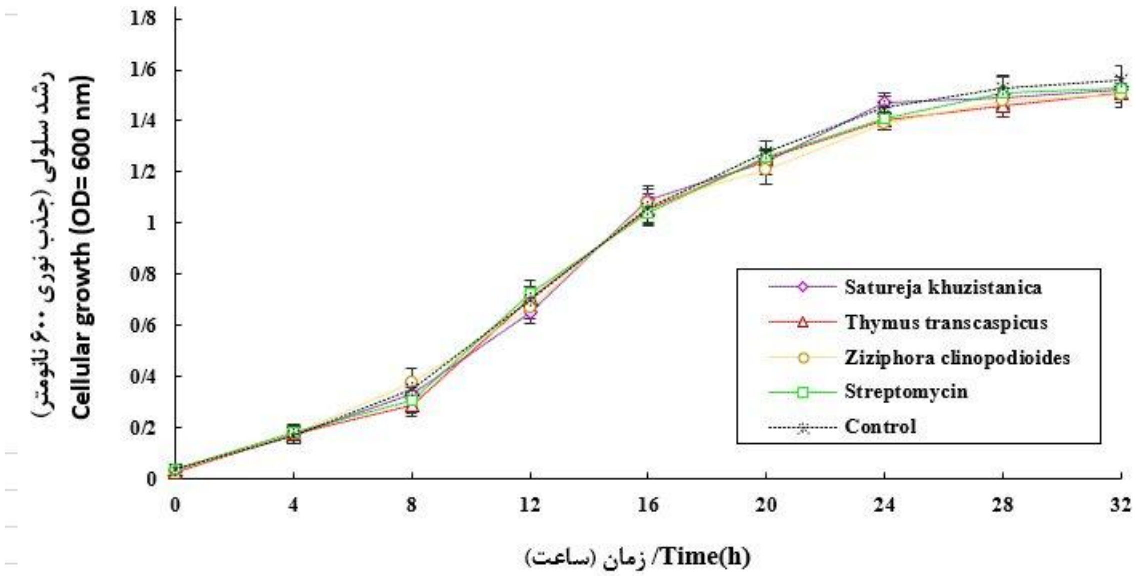
بین قطر هاله بازدارنده و مقادیر حداقل غلظت بازدارنده و کشنده ارتباطی معکوس وجود دارد (Bassole *et al.*, 2011). یکی از دلایل تفاوت در نتایج مشاهده شده در مورد تأثیر اسانس‌ها بر باکتری این است که متابولیت‌ها به چندین روش مختلف می‌توانند با باکتری‌ها برهمکنش داشته باشند تا آن‌ها را از بین ببرند و یا رشد باکتری را متوقف سازند. از بین بردن DNA، تخریب دیواره سلولی و یا تحت تأثیر قرار دادن غشای سیتوپلاسمی می‌توانند از دلایل آن باشد (Chouhan *et al.*, 2017). برای بررسی اثرات اسانس بر فاکتورهای پر آزاری باکتری بهتر است غلظتی انتخاب شود که اثر ایستایی، بازدارندگی و یا کشندگی روی سلول‌های باکتری نداشته باشد در غیر این صورت هرگونه تغییر در فاکتورهای پر آزاری را می‌توان مرتبط با آن دانست. بنابراین برای جلوگیری از آسیب‌رسانی به سلول در مقادیر حد بازدارندگی و بالاتر از آن، غلظت اسانس‌های مورد آزمون برای سنجش صفات پر آزاری، در سطوح Sub- MIC که باعث آسیب رساندن به زیست‌پذیری سلول نمی‌شوند، تعیین گردید.

بررسی رشد

براساس تجزیه‌وتحلیل منحنی رشد می‌توان بیان کرد که تأثیر معنی‌داری در الگوی رشد شاهد و سلول‌های تیمار شده با اسانس در غلظت‌های Sub-MIC مورد آزمون وجود ندارد (شکل ۲). نرخ رشد و حداکثر جمعیت باکتری در غلظت‌های Sub-MIC در تیمار با شاهد مشابه می‌باشد و تأثیرات فاز تأخیری در چرخه رشد کشت‌های باکتریایی حاوی اسانس یا استرپتومایسین مشاهده نشده است.

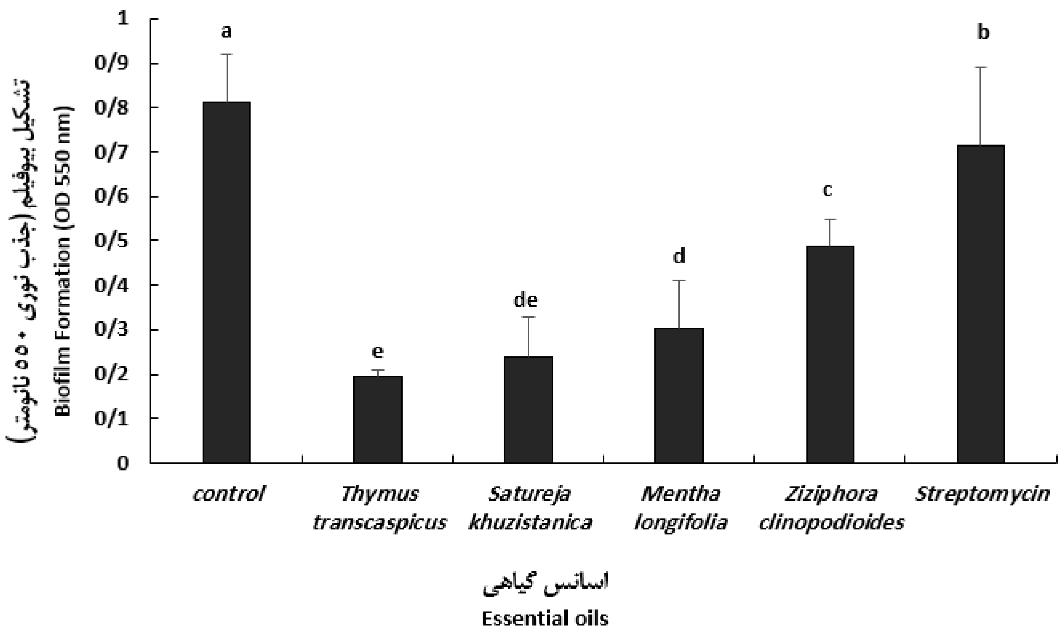
تشکیل بیوفیلم

میزان تشکیل بیوفیلم با کمی‌سازی شدت رنگ کریستال ویوله متصل شده به سلول‌های بیوفیلم در طول موج ۵۵۰ نانومتر تخمین زده شد. نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش (شکل ۳) نشان می‌دهد که اسانس‌های به کار گرفته‌شده در توسعه طبیعی بیوفیلم در مقایسه با نمونه‌های شاهد، اختلال ایجاد نموده‌اند. آویشن خراسانی و مرزه خوزستانی با درصد بازدارندگی به‌ترتیب ۷۵ و ۷۰ درصد قوی‌ترین اثر مهارکنندگی را بر میزان تشکیل بیوفیلم نشان داده و اسانس پونه با ۶۲ درصد و کاکوتی با ۴۰/۲ درصد بازدارندگی در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. هرچه مقدار MIC اسانس‌های مورد آزمون کمتر باشد اثر مهارکنندگی قوی‌تری را بر تشکیل بیوفیلم دارند. آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین درصد بازدارندگی کمتری (۱۲ درصد) نسبت به سایر تیمارها نشان داد و کاهش معنی‌داری را در تشکیل بیوفیلم در جدایه باکتری ایجاد نکرد. اسانس‌های حاوی ترکیبات فنلی بیشترین اثرگذاری را بر مهار تشکیل بیوفیلم نشان می‌دهند (Romero *et al.*, 2016). کاریزانو و همکاران (Carezzano *et al.*, 2017) نیز به بررسی اثر اسانس آویشن باغی و مرزنجوش در غلظت‌های زیربازدارندگی بر تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های باکتری *Pseudomonas syringae* پرداخته‌اند که در این بررسی اسانس آویشن باغی بیشترین کاهش را در تشکیل بیوفیلم نشان داد. نتایج حاصل از این پژوهش با بررسی‌های انجام‌شده توسط کاوانو و ریبک (Kavanaugh & Ribbeck, 2012) مطابقت دارد که در آن گفته‌شده که اسانس گیاهان آویشن باغی، بالزام و نوعی دارچین توانایی بیشتری در کاهش بیوفیلم باکتری‌های *Pseudomonas* spp. نسبت به آنتی‌بیوتیک مورد استفاده دارد.



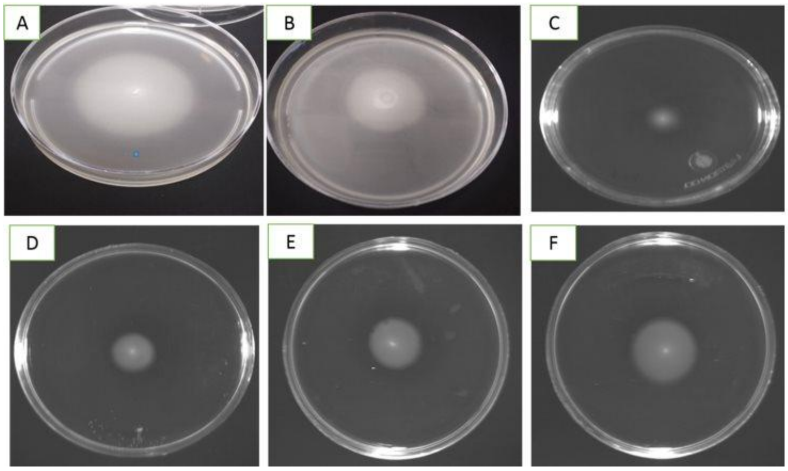
شکل ۲- منحنی رشد جدایه باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* در حضور مقادیر Sub-MIC اسانس‌های مختلف و شاهد استرپتومایسین در طول یک دوره ۳۲ ساعته

Figure 2- Growth curve of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in the presence of sub-MIC amounts of different essential oils and control streptomycin during a 32-hour period



شکل ۳- توسعه بیوفیلم توسط جدایه باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* در حضور مقادیر Sub-MIC اسانس‌های مختلف گیاهی و استرپتومایسین

Figure 3- Biofilm development by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in the presence of sub-MIC values of different plant essential oils and streptomycin



شکل ٤- آزمون تحرک شناوری جدایه باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* در محیط ۰/۳٪ آگار بعد از ۳۲ ساعت. A: جدایه باکتری B: استرپتومایسین؛ C: جدایه باکتری تحت تیمار اسانس آویشن خراسانی، D: جدایه باکتری تحت تیمار اسانس مرزه خوزستانی، E:جدایه باکتری تحت تیمار اسانس پونه و F: جدایه باکتری تحت تیمار اسانس کاکوتی

Figure 4- Swimming motility test of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on 0.3% agar medium after 32 hours.A: bacterial strain;B: Steptomycin; C: bacterial strain undertreatment of *Thymus transcaspicus*; D: *Satureja khuzistanica; E: Mentha longifolia* and F: *Ziziphora clinopodioides*

تحرک توده‌ای و شناوری

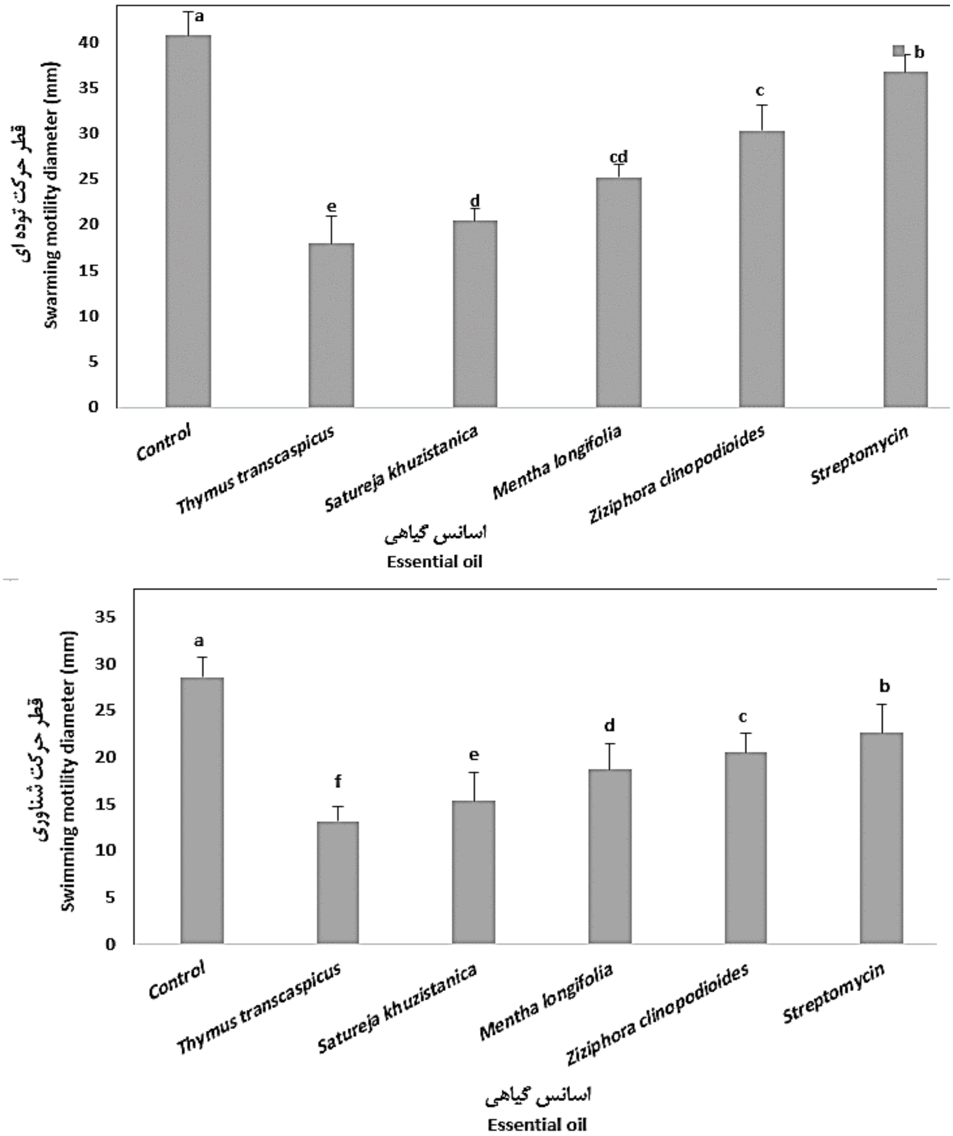
قابلیت تحرک توده‌ای سلول‌های تحت تیمار اسانس نسبت به شاهد ۲۵ تا ۵۵٪ و قابلیت تحرک شناوری ۱۸/۴۲ تا ۳۵/۷۱٪ کاهش یافته است (شکل ۴). بیشترین اثر کاهش تحرک جدایه *Pss* در تیمار با اسانس آویشن خراسانی و مرزه خوزستانی دیده شد. در تیمار آنتی بیوتیک استرپتومایسین قطر حرکت باکتری بیشتر از تیمارهای اسانس و کمتر نسبت به شاهد (باکتری بیمارگر) تعیین شد. مشاهدات ما نشان می‌دهد که تحرک باکتری در پلیت‌های مایه‌زنی شده با جدایه باکتری که تحت تیمار اسانس‌ها قرارگرفته بود، در مقایسه با نمونه شاهد کاهش یافت که میزان آن بین اسانس‌ها متفاوت است (شکل ۵).

بررسی اثر اسانس آویشن و ترکیبات فعال آن (کارواکرول و تیمول) روی حرکت شناوری باکتری *Pseudomonas fluorescens* مشخص نمود که اسانس آویشن باعث کاهش تحرک باکتری نسبت به شاهد شده است (Myszka *et al*., 2016). اسانس آویشن، حرکت توده‌ای و شناوری باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*، را به‌ترتیب به میزان ۲۴٪ و ۱۹٪ کاهش داده است (Singh *et al*., 2017).

ارزیابی تولید سیرینگومایسین در حضور اسانس‌های گیاهی

جدایه بیماری‌زای *Pss* با تولید زهرابه سیرینگومایسین مانع از رشد قارچ *G. candidum* روی محیط کشت PDA می‌شود و از همین آزمون جهت تفکیک جدایه‌های مثبت در تولید زهرابه استفاده می‌شود.

بیمارگر تحت تیمار غلظت زیر-بازدارندگی اسانس‌های گیاهی سبب کاهش در تولید سیرینگومایسین در دامنه (۱/۱۵ تا ۱/۷۶ برابر) نسبت به شاخص اندازه‌گیری در شاهد (قطر پرگنه قارچ) شد (شکل ۶). در شرایط حضور اسانس‌های گیاهی، تولید کمتر سیرینگومایسین را می‌توان به‌عنوان حساسیت بیشتر باکتری نسبت به اسانس‌های گیاهی در نظر گرفت. بیش‌ترین میزان بازدارندگی از رشد قارچ مربوط به اسانس کاکوتی و کمترین میزان بازدارندگی از رشد قارچ مربوط به آویشن خراسانی و مرزه خوزستانی است. بر این اساس دو اسانس آویشن خراسانی و مرزه خوزستانی با اندازه‌گیری قطر کلنی قارچ به ترتیب ۲۳ و ۲۰ میلی‌متر، درکاهش تولید سیرینگومایسین و افزایش رشد قارچ به‌ترتیب به میزان ۱/۷۶ و ۱/۵ برابر در مقایسه با شاهد (عدم تیمار با اسانس) مؤثر می‌باشند. در مطالعات پیشین نیز به بررسی اثر اسانس آویشن باغی و مرزنجوش در تولیدسیرینگومایسین جدایه های‌گونه های مختلف *Pseudomonas* پرداخته‌اند که شواهدی مشابه با یافته‌های ما ارائه شده و نشان داده‌اند که این دو اسانس خاصیت ضدبیوفیلم و ضد زهرابه علیه جدایه‌های این باکتری داشته‌اند (Carezzano *et al*., 2017).



شکل ۵- تحرک توده‌ای و شناوری جدایه باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* پس از قرارگیری در معرض اسانس‌های گیاهی و استرپتومایسین

میزان تحرک پس از ۳۲ ساعت اندازه‌گیری گردید و نتایج برحسب میلی‌متر می‌باشد.

Figure 5- Swarming and swimming motility of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* after exposure to plant essential oils and streptomycin

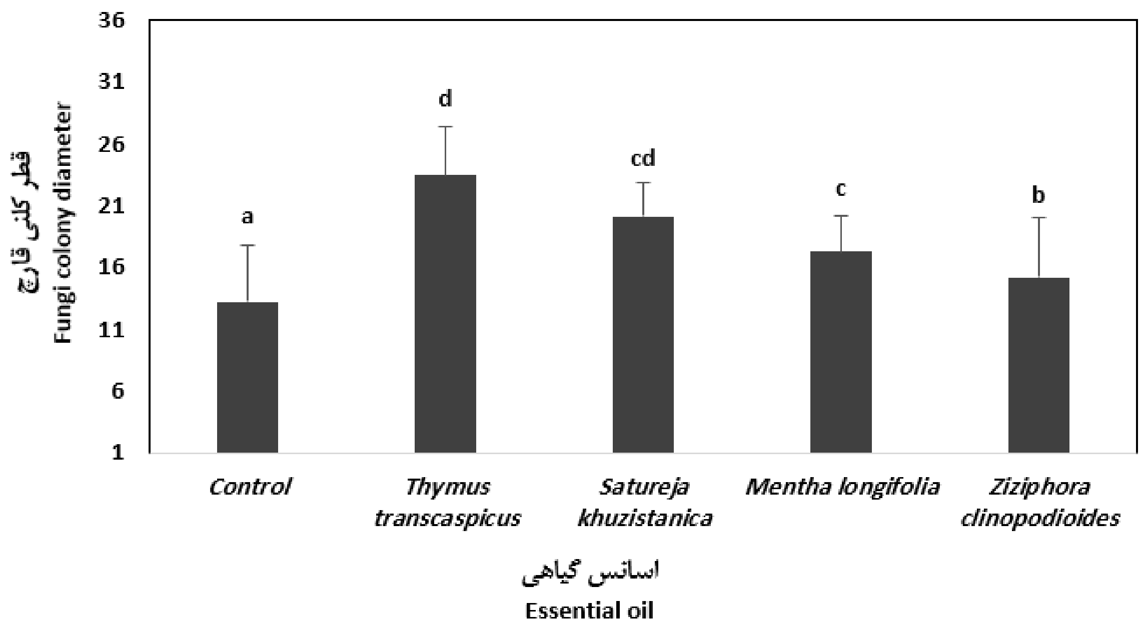
The mobility was measured after 32 hours and the results are in millimeters.

ارزیابی توان اسانس‌های گیاهی در کاهش علائم بیمارگر *Pss* در میوه‌های نارس گیلاس

جدایه بیمارگر تحت تیمار غلظت‌های MIC اسانس‌ها، به میوه های نارس گیلاس مایه‌زنی و تا یک هفته بعد علائم بررسی شد. براساس مشاهدات، بروز علائم روی میوه گیلاس متفاوت و علائم نکروز در اندازه‌های متفاوت ایجاد گردید. در این آزمون هیچ‌گونه علائمی روی میوه گیلاس مایه‌زنی شده با اسانس آویشن مشاهده نگردید و به‌طور ۱۰۰ درصد از بروز نکروز جلوگیری کرد (شکل ۷).

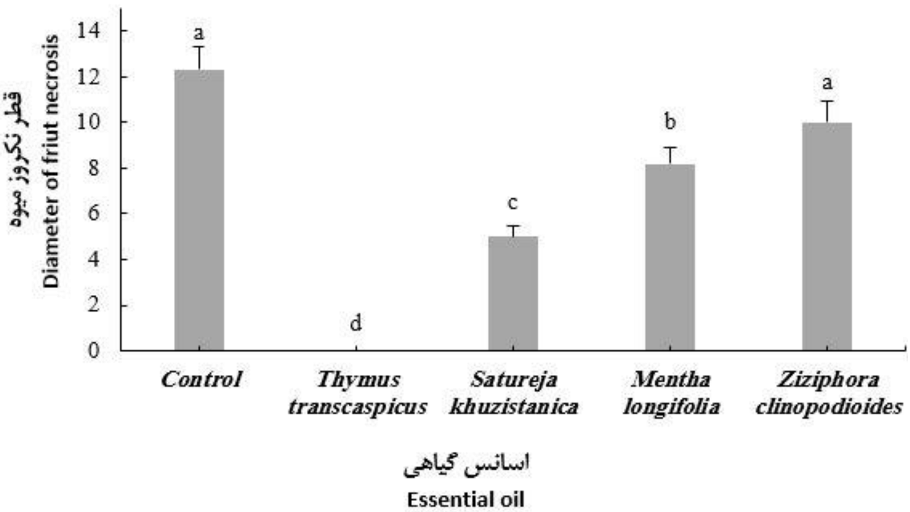
تولید فاکتورهای پر آزاری با افزایش شدت بیماری‌زایی ارتباط مستقیم دارد، اما به‌تنهایی برای ایجاد بیماری‌زایی باکتری *Pss* روی درختان هسته‌دار مؤثر نمی‌باشد (Bender & Scholz-Schroeder,

2004). چهار اسانس انتخابی مورد آزمون همگی بر کاهش اثرگذاری فاکتورهای پر آزاری در *Pss* نقش داشتند که میزان اثرگذاری بسته به مواد متشکله اسانس متفاوت است. هرچه مواد فنولیک در اسانس بالاتر باشد خواص ضدمیکروبی آن‌علیه باکتری بیمارگر گیاهی بیشتر می‌شود (Alymanesh & Mirzaei, 2013). اُلیوا و همکاران (Oliva *et al.*, 2015) دو اسانس آویشن باغی و مرزنجوش را جهت جلوگیری از رشد باکتری *Pss* مورد آزمایش قراردادند. تحقیقات آن‌ها نشان داد که این دو اسانس به‌علت بالا بودن درصد کارواکرول، بیشترین تأثیر را در کاهش رشد باکتری نسبت به شاهد داشتند.



شکل ٦- میزان تولید سیرینگومایسین توسط جدایه باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* در حضور مقادیر Sub-MIC اسانس‌های گیاهی (براساس مقایسه قطر پرگنه قارچ *Geotrichum candidum*)

Figure 6- The amount of syringomycin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in the presence of sub-MIC values of plant essential oils (based on the comparison of the colony diameter of *Geotrichum candidum*)



شکل ۷- تأثیر اسانس‌های گیاهی بر توان ایجاد بیماری‌زایی جدایه *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* روی میوه گیلاس نارس و اندازه‌گیری قطر نکروز پس از یک هفته

Figure 7- The effect of plant essential oils on the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on green cherry fruit and measuring the necrosis diameter after one week

جدول ۳- نتایج آنالیز GC-MS برای اسانس‌های مرزه خوزستانی، آویشن خراسانی، پونه و کاکوتی

ترکیبات اصلی موجود در اسانس به‌صورت تیره مشخص گردیده است.

Table 3- Results of GC-MS analysis for *Satureja khuzistanica*, *Thymus transcaspicus*, *Mentha longifolia* and *Ziziphora clinopodioides* essential oils

The main ingredients in the essential oil are highlighted in bold.

***Satureja khuzistanica* components**

RI	ترکیب Compound	درصد Percentage	RI	ترکیب Compound	درصد Percentage
924	tricyclene	t	1635	γ-eudesmol Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5 β-ol	0.2
930	a-thujene	0.3	1642	ol	0.1
937	a-pinene	1.5	1643	hinseol	0.1
952	camphene	0.3	1650	agarospirol	0.1
964	benzaldehyde	t	1660	valerianol	0.1
966	5- Methyl furfural	t	1678	unknown	0.3
980	B-pinene	0.3	1686	α-bisabolol	0.5
983	1-octen-3o1	0.1	1700	heptadecane	t
992	myrcene	2.5	1762	Benzyl benzoate	t
995	3-octanol	0.1	1843d	Hexahydrofarnesyl acetone	0.3
1004	a-phellandrene	0.6		Total Identified 99.6%	
1011	δ -3-carene	0.2			
1018	a-terpinene	2.7			
1028	**p-cymene**	**9.1**			
1032	β- phellandrene	1.0			
1033	1,8-cineol	0.2			
1041	Cis-ocimene	t			
1052	trans- ocimene	0.1			
1061	**γ-terpinene**	**5.4**			
1072	cis-sabinene hydrate	0.2			
1073	n-octanol	0.1			
1089	terpinolene	0.5			
1091	ρ-cymenene	0.8			
1099	trans-sabinene hydrate	0.1			
1103	linalool	1.7			
1169	borneol	0.1			
1179	terpinen-4-ol	0.8			
1246	carvacrol methyl ether	1.1			
1302	**carvacrol**	**49.4**			
1362	eugenol	1.2			
1375	carvacrol acetate	1.6			
1476	Methyl- ρ-anisate	t			
1422	β-caryophyllene	2.2			
1438	α-trans-bergamotene	0.4			
1456	α- humulene	0.1			
1456	Geranyl acetone	0.7			
1484	γ-curcumene	0.1			
1483	αr- curcumene	0.2			
1507	β-bisabolene	9.3			
1525	β-sesquiphellandrene 2(4H)-Benzofuranone,5,6,7,7a-tetrahydro	0.2			
1538	4,4,7a-trimethyl-	0.1			
1534	trans- γ-bisabolene	1.6			
1558	elemicin	t			
1585	Caryophyllene oxide	1.0			
1614	unknown	t			

Thymus transcaspicus components		
RI	**ترکیب Compound**	**درصد Percentage**
926	tricyclene	t2
931	α-thujene	1.2
939	α-pinene	1.2
951	unknown	t
954	camphene	0.8
963	benzaldehyde	t
980	β-pinene	0.3
982	1-octen-3-ol	0.3
985	3-octanone	0.3
993	myrcene	1.4
996	3-octanol	0.1
1005	α-phellandrene	0.3
1012	δ-3-carene	0.1
1019	α-terpinene	2.4
1029	ρ-cymene	6.7
1023	β-phellandrene	0.6
1033	1,8-cineol	0.8
1052	β-E-ocimene	0.1
1061	**γ-terpinene**	**8.0**
1072	cis-sabinene hydrate	0.7
1090	terpinolene	0.3
1099	trans-sabinene hydrate	0.1
1098	linalool	0.2
1124	trans-ρ-mentha-2,8-dien-1-ol	0.1
1147	camphor	t
1169	unknown	0.2
1170	borneol	1.5
1180	terpinen-4-ol	1.0
1190	unknown	0.2
1184	ρ-cymen-8-ol	0.1
1189	α-terpineol	0.3
1192	cis-dihydrocarvone	0.1
1238	thymol methyl ether	1.5
1243	carvacrol methyl ether	0.2
1244	cumin aldehyde	t
1246	**pulegone**	**2.4**
1295	**thymol**	**39.6**
1303	**carvacrol**	**21.4**
1345	piperitenone	1.1
1354	thymol acetate	0.3
1362	eugenol	0.1
1374	carvacrol acetate	0.2
1389	β-bourbonene	t
1422	β-caryophyllene	0.7
1434	β-copaene	t
1437	trans-α-bergamotene	t
1440	aromadendrene	0.1
1455	α-humulene	t
1462	allo-aromadenderene	t
1482	γ-murrolene	0.1
1498	viridiflorene	0.2
1498	viridiflorene	0.2
1502	α-muurolene	t
1508	β-bisabolene	0.4
1516	γ-cadinene	0.1
1524	δ-cadinene	0.2
1533	trans-γ-bisabolene	0.9
1578	spathulenol	0.2
1584	caryophyllene oxide	0.2
	Total Identified	99.6

Mentha longifolia components		
RI	ترکیب Compound	درصد Percentage
0852	butanoic acid	1.6
0880	ethyl2-methylbutyrate	0.4
0918	γ-terpinene	0.5
0936	α-pinene	5.5
0946	α-pipene	1.6
0976	sabinene	7.5
0980	β-pinene	3.5
0991	β-myrcene	0.3
	oxygenated monoterpenes	
1033	**1,8-cineole**	8.5
1050	β-ocimene	t
1062	thymol	0.2
1072	**ρ-mentha-3,8-diene**	7.2
1088	α-terpinolene	1.36
1092	butanoic acid,2-methyl,3-methyl butyl ester	0.7
1110	pentanoic acid,3-methylbutyl ester	0.5
1124	3-octanol acetate	0.4
1143	2,6-dimethyl-2,4,6-oc tatriene	6.5
1150	**Cis-dihydrocarvone**	10.6
1154	3-methylene-1,5,5-trimethylcyclohexene	t2
1168	isopulegone	4.5
1180	benihinal	0.3
1188	benzofuran,4,7-dimethyl	0.6
1193	myrtenal	t
1237	pulegone	5.5
1244	**piperitone**	13.3
1252	Piperitone oxide	0.3
1268	cyclopentane,1,2-dimethyl-3-(1-methylethenyl)	t2
1285	borneol,acetate	0.5
1290	cyclohexanone,3-vinyl-3-methyl	2.2
1398	2,3-dimethylhydroquinone	1.1
1312	4-hydroxy-3-methylacetophenone	0.4
1354	pulespenone	6.4
1380	β-elemene	0.5
1382	durohydroquinone	0.2
1385	β-caryophyllene	2.2
1390	β-cubebene	0.4
1454	α-humulene	0.2
1468	(+)-epi-bicyclosesquiphellandrene	0.3
1482	germacrene-D	1.5
1524	γ-cadinene	0.2
	Total Identified	97.46

Ziziphora clinopodioides components		
RI	ترکیب Compound	درصد Percentage
926	α-Thujene	0.1
935	α-pinene	0.3
970	sabinene	0.2
976	β-pinene	0.6
981	myrcene	0.2
1013	α-Terpinene	tr
1015	ρ-Cymene	0.3
1026	1,8-Cineole	2.7
1053	γ-terpinene	0.2
1064	terpinolene	0.5
1082	Trans-Sabinene hydrate	0.1
1085	Linalool	tr
1111	cis-verbenol	0.1
1124	Trans-verbenol	0.1
1140	**p-menth-3-en-8-ol**	12.5
1152	Menthone	1.8
1160	Neomenthol	2.1
1166	Menthol	0.1
1171	Terpinen-4-ol	0.4
1182	Isomenthol	1.6
1186	Verbenone	0.2
1202	Cuminyl aldehyde	0.8
1225	**Pulegonee**	45.8
1234	Piperitone	1.4
1246	Carvone	0.1
1268	**Thymol**	8
1280	Isomenthyl acetate	0.5
1287	Eucarvone	0.2
1320	**Piperitenone**	17.4
1391	β-Bourbonene	0.1
1484	Germacrene D	1.1
	Total Identified	95.4

آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس

اسانس مرزه خوزستانی غنی از کارواکرول (۴۹/۴٪) می‌باشد و سایر ترکیبات اصلی آن بتا- بیسابولن (۹/۳٪)، پی- سیمن (۹/۱٪) و گاما- ترپینن (۵/۴٪) مشخص شد. در اسانس آویشن خراسانی تیمول (۳۹/۶٪) به‌عنوان جزء عمده تعیین گردید و کارواکرول (۲۱/۴٪) و گاما- ترپینن (۸٪) جزء سایر ترکیبات اصلی بودند. پیپریتون (۱۳/۳٪)، سیس- دی هیدرو کارون (۱۰/۶٪)، ۱ و ۸- سینئول (۸/۵٪)

غالب‌ترین ترکیبات اسانس پونه بودند و پی- منتا-۳ و ۸- دیئن (۷/۲٪)، پولسپنون (۶/۴٪) و آلفا-پین (۵/۵٪) نیز در مقادیر کمتری یافت شدند. در اسانس کاکوتی نیز ترکیبات غالب پولگون (۴۲/۷٪)، پیپریتنون (۱۶/۴٪)، پی- منتا-۳-اِن-۸-اُل (۱۲/۵٪) و تیمول (۸٪) تعیین گردیدند. به‌طورکلی مونوترپن‌های اکسیژنه به‌عنوان ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده اسانس‌های موردمطالعه تشخیص داده شدند (جدول ۳).

در پژوهش حاضر، تیمول، کارواکرول و گاما-ترپینن به‌عنوان سه جزء اصلی و فعال اسانس آویشن خراسانی تشخیص داده شدند که در مطالعات ابراهیمی و همکاران (Ebrahimi *et al*., 2008) نیز به‌عنوان ترکیبات اصلی اسانس آویشن خراسانی گزارش‌شده است. کارواکرول نیز به‌عنوان ترکیب اصلی اسانس مرزه خوزستانی در مطالعات فرزانه و همکاران (Farzaneh *et al*., 2015) و حاجیان ملکی (Hajian-Maleki *et al*., 2019) گزارش‌شده است. سیس-دی هیدروکارون و پیپریتون به‌عنوان مهم‌ترین ترکیبات اسانس پونه در این پژوهش و مطالعات پیشین (Golparvar *et al*., 2015) تشخیص داده شد. همچنین مطابق با مطالعات پیشین (Amiri, 2009) پولگون و پیپریتنون و پی- منتا ۳-اِن-۸ اُل به‌عنوان سه ترکیب غالب در اسانس کاکوتی تشخیص داده شد. به‌نظر می‌رسد بالاترین مقادیر ترکیبات موجود در اسانس‌ها، دارای قدرت ضد باکتریایی بالاتری می‌باشند.

نتیجه‌گیری

ترکیبات گیاهی مورد آزمون در غلظت زیر-بازدارندگی، پتانسیل قابل قبولی در مهار عوامل پر آزاری بیمارگر در آزمون‌های درون شیشه نشان دادند. با توجه به روند رو به گسترش استقبال عمومی کاربران از ترکیبات طبیعی کنترلی در حوزه بیماری‌های گیاهی، به‌نظر می‌رسد برنامه‌ریزی در راستای چگونگی بکارگیری از فرآورده‌های گیاهی در جهت کاهش مصرف سموم قابل بررسی و نیازمند آزمایشات تکمیلی می‌باشد. در ارتباط با بیماری‌های مستقر در باغ مانند شانکر باکتریایی، به‌منظورکاهش گسترش علایم بیماری و افزایش طول عمر درخت می‌توان از مواد مؤثره اصلی (مونوترپن‌های اکسیژنی) اسانس‌های گیاهان مرزه خوزستانی و آویشن خراسانی به عنوان ساختار شیمیایی الگو در جهت سنتز مواد ضدمیکروبی با استفاده از تخصص افراد در حیطه شیمی و داروسازی بهره گرفت. بررسی پایداری و حفظ ویژگی‌های ضد میکروبی مواد سنتز شده در شرایط آزمایشگاهی و باغی پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

نگارندگان از دانشگاه فردوسی مشهد به خاطر حمایت مالی این پروژه با کد ۳/۵۱۶۷۱ قدردانی می‌نمایند.

Refrences

1. Adams, R.P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (Vol. 456, pp. 544-545). Carol Stream: Allured publishing corporation.
2. Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology* Academic Press. San Diego, USA.
3. Alymanesh, MR., & Mirzaei, H. (2013). *Using some essential oils in the control of bacterial canker disease of stone fruit*. Proceeding of the second National Congress on Medicinal Plants. 15-16 May, Tehran, Iran, 1135.
4. Amiri, H. (2009). Influence of growth phase on the essential oil composition of *Ziziphora clinopodioides* Lam. *Natural product research, 23*(7), 601-606. https://doi.org/10.1080/14786410802113995
5. Bahar, M., Mojtahedi, A., & Akhiani, A. (1985). Bacterial Canker Apricot trees in Esfahan. Iran. *Plant Patho*, *18*, 58-68.
6. Bassole, I.H.N., Lamien-Meda, A., Bayala, B.O.L.C., Obame, L.C., Ilboudo, A.J., Franz, C., & Dicko, M.H. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*, *18*(12), 1070-1074. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.05.009
7. Bender, C.L., & Scholz-Schroeder, B.K. (2004). New insights into the biosynthesis, mode of action, and regulation of syringomycin, syringopeptin, and coronatine. In *Virulence and gene regulation* (pp. 125-158). Springer, Boston, MA.
8. Bultreys, A., & Kaluzna, M. (2010). Bacterial cankers caused by *Pseudomonas syringae* on stone fruit species with special emphasis on the pathovars syringae and morsprunorum race 1 and race 2. *Journal of Plant Pathology*, S21-S33.
9. Carezzano, M.E., Sotelo, J.P., Primo, E., Reinoso, E.B., Paletti Rovey, M.F., Demo, M.S., & Oliva, M.D.L.M. (2017). Inhibitory effect of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* essential oils on virulence factors of phytopathogenic *Pseudomonas syringae* strains. *Plant Biology, 19*(4), 599-607. https://doi.org/10.1111/plb.12572
10. Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines, 4*(3), 58. https://doi.org/10.3390/medicines4030058
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility

tests; approved standard—12th ed. M02-A13. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. https://clsi.org

12. Ebrahimi, S.N., Hadian, J., Mirjalili, M.H., Sonboli, A., & Yousefzadi, M. (2008). Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food Chemistry*, *110*(4), 927-931. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.083
13. Farhadfar, S., Keshavarzi, M., Bouzari, N., Moghadam, L., & Soleimani, A. (2016). Susceptibility of cherries to bacterial canker (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) in field and laboratory. *International journal of Agriculture and Forestry*, *6*(1), 20-7. https://doi.org/10.5923/j.ijaf.20160601.04
14. Farzaneh, M., Kiani, H., Sharifi, R., Reisi, M., & Hadian, J. (2015). Chemical composition and antifungal effects of three species of *Satureja* (*S. hortensis*, *S. spicigera*, and *S. khuzistanica*) essential oils on the main pathogens of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *109*, 145-151. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.06.014
15. Gasic, K., Prokic, A., Ivanovic, M., Kuzmanovic, N., & Obradovic, A. (2012). Differentiation of *Pseudomonas syringae* pathovars originating from stone fruits. *Pesticidi i fitomedicina*, *27*(3), 219-229. https://doi.org/102298/PIF1203219G
16. Golparvar, A.R., Hadipanah, A., & Mehrabi, A.M. (2015). Diversity in Chemical composition from two ecotypes of (*Mentha longifolia* L.) and (*Mentha spicata* L.) in Iran climatic conditions. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, *6*(4), 26-33.
17. Hajian-Maleki, H., Baghaee-Ravari, S., & Moghaddam, M. (2019). Efficiency of essential oils against *Pectobacterium carotovorum* subsp. carotovorum causing potato soft rot and their possible application as coatings in storage. *Postharvest Biology and Technology*, *156*, 110928. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.06.002
18. Hwang, M.S., Morgan, R.L., Sarkar, S.F., Wang, P.W., & Guttman, D.S. (2005). Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(9), 5182-5191. https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5182-5191.2005
19. Ichinose, Y., Taguchi, F., & Mukaihara, T. (2013). Pathogenicity and virulence factors of Pseudomonas syringae. *Journal of General Plant Pathology*, *79*(5), 285-296. https://doi.org/10.1007/s10327-013-0452-8
20. Jaymand, K., & Rezaee, M. (2007). Essential oil, Distillations Apparatuses, test Method of essential oil and Retention Indices in Essential oil Analysis. *Iranian Society of Medicinal Plants. Tehran*, *12*, 106-108.
21. Kavanaugh, N.L., & Ribbeck, K. (2012). Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(11), 4057-4061. https://doi.org/10.1128/AEM.07499-11
22. Kennelly, M.M., Cazorla, F.M., de Vicente, A., Ramos, C., & Sundin, G.W. (2007). Pseudomonas syringae diseases of fruit trees: progress toward understanding and control. *Plant Disease*, *91*(1), 4-17.https://doi.org/ 10.1094/PD-91-0004
23. Khodaygan, P., Sedaghati, A., Hosseinipour, A., & Baghaee-Ravari, S. (2012). Study on canker disease of stone friuts and antibacterial effects of some essential oils on its causal agent in Kerman province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, *48*(3), 303-317.
24. López Belchí, M.D., Cantó-Tejero, M., & Pascual-Villalobos, M.J. (2021). New insights into Biopesticides: Solid and liquid formulations of essential oils and derivatives. *Frontiers in Agronomy*, *3*, 763530. https://doi.org/10.3389/fagro.2021.763530
25. Matas, I.M., Lambertsen, L., Rodríguez-Moreno, L., & Ramos, C. (2012). Identification of novel virulence genes and metabolic pathways required for full fitness of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive (*Olea europaea*) knots. *New Phytologist*, *196*(4), 1182-1196. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04357.x
26. Myszka, K., Schmidt, M.T., Majcher, M., Juzwa, W., Olkowicz, M., & Czaczyk, K. (2016). Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens KM121* by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *114*, 252-259. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.07.006
27. Oliva, M.D.L.M., Carezzano, M.E., Giuliano, M., Daghero, J., Zygadlo, J., Bogino, P., & Demo, M. (2015). Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on phytopathogenic strains isolated from soybean. *Plant Biology*, *17*(3), 758-765. https://doi.org/10.1111/plb.12282
28. O'May, C., & Tufenkji, N. (2011). The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(9), 3061-3067. https://doi.org/10.1128/AEM.02677-10
29. Pavela, R., & Benelli, G. (2016). Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends in Plant Science*, *21*(12), 1000-1007. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.005
30. Ramezanian, A., Azadi, M., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., & Saharkhiz, M.J. (2016). Effect of *Zataria multiflora Boiss* and *Thymus vulgaris* L. essential oils on black rot of 'Washington Navel'orange fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *112*, 152-158. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.10.011
31. Rasoolzadegan, Y. (1997). *Temperate Zone Fruits***.** Esfahan University pub. 759 pp.

32. Romero, C.M., Vivacqua, C.G., Abdulhamid, M.B., Baigori, M.D., Slanis, A.C., Allori, M.C.G.D., & Tereschuk, M. . (2016). Biofilm inhibition activity of traditional medicinal plants from Northwestern Argentina against native pathogen and environmental microorganisms. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *49*, 703-712. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0452-2016
33. Santos, C.A., Almeida, F.A., Quecán, B.X., Pereira, P.A., Gandra, K., Cunha, L.R., & Pinto, U.M. (2020). Bioactive properties of *Syzygium cumini* (L.) skeels pulp and seed phenolic extracts. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 990. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00990
34. Shabani, B., Rezaei, R., Charehgani, H., & Salehi, A. (2019). Study on antibacterial effect of essential oils of six plant species against *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall 1902 and *Pseudomonas fluorescens* Migula 1894. *Journal of Plant Pathology*, *101*(3), 671-675. https://doi.org/10.1007/s42161-019-00266-x
35. Singh, A., Gupta, R., Tandon, S., & Pandey, R. (2017). *Thyme* oil reduces biofilm formation and impairs virulence of *Xanthomonas oryzae*. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1074. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01074
36. Spotts, R.A., Wallis, K.M., Serdani, M., & Azarenko, A.N. (2010). Bacterial canker of sweet cherry in Oregon-Infection of horticultural and natural wounds, and resistance of cultivar and rootstock combinations. *Plant Disease*, *94*(3), 345-350. https://doi.org/10.1094/PDIS-94-3-0345